



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월31일
(11) 등록번호 10-2006101
(24) 등록일자 2019년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/50 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/50 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0017275
(22) 출원일자 2018년02월12일
심사청구일자 2018년02월12일
(56) 선행기술조사문헌
CN101967485 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
최한석
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동), 의과대학 생리학교실
송정아
서울특별시 송파구 문정로 83(문정동, 문정래미안아파트), 103동 103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 13 항

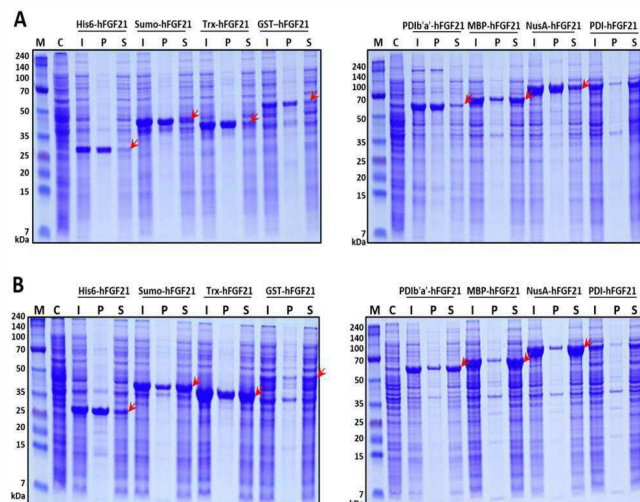
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 인간 섬유아세포 성장인자 21 재조합 단백질의 수용성 과발현 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 섬유아세포 성장인자 21 재조합 단백질의 수용성 과발현 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포, 이를 이용한 재조합 단백질의 생산방법 및 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21을 제공한다. 본 발명에 따른 재조합 벡터 또는 생산방법은 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21)의 수용성 발현 효율 및 생산성을 향상시킬 수 있으며, 이렇게 얻어진 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21은 당뇨, 비만을 포함하는 대사 질환 질병에 대한 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 2319/24 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

(72) 발명자

웬민탄

서울특별시 광진구 광나루로 430-3(화양동), 102호

웬안옥

서울특별시 송파구 강동대로 13(풍납동, 서울아산병원), 패밀리타운 A동 814호

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질의 수용성 항상 태그를 코딩하는 유전자; 및

서열번호 1로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 인간 섬유아세포 성장인자 21(human fibroblast growth factor 21; hFGF21) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 수용성 항상 태그는 말토스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP)인 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 말토스 결합 단백질 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 수용성 항상 태그를 코딩하는 유전자와 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자 사이에 담배 식각 바이러스 단백질 분해효소 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 담배 식각 바이러스 단백질 분해효소 인식 위치는 서열번호 10으로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 7

제1항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 10

제1항에 따른 재조합 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계;

상기 형질전환체를 배양하여 MBP-hFGF21 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및

상기 재조합 단백질로부터 MBP 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21)의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 MBP 태그를 제거하는 단계는 재조합 단백질에 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제를 처리하는 것을 특징으로 하는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21의 생산방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 MBP 태그가 제거된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21을 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21의 생산방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법으로 생산된, 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 코딩되는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 단백질.

청구항 14

재조합 단백질의 수용성 향상 태그 및 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인간 섬유아세포 성장인자 21 재조합 단백질의 수용성 과발현 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 수용성 향상 태그(solubility enhancing tag) 및 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포, 이를 이용한 재조합 단백질의 생산방법 및 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21을 제공한다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 섬유아세포 성장인자 21(Fibroblast growth factor 21, FGF21)은 FGF 패밀리에 속하는 하나로서, 아미노산 28개의 신호 펩타이드를 포함하는 181개 아미노산 잔기로 이루어진 단백질이다. FGF21은 간, 심장, 뇌, 지방세포 및 이자와 같은 여러 개의 장기에서 합성되며, 당뇨병이 있는 붉은털 원숭이(rhesus monkeys)에서 포도당 흡수를 촉진하고 공복 혈당, 인슐린, 및 혈장 프룩토사민(fructosamine) 농도를 현저하게 낮추는 것으로 보고되었고, FGF21의 다른 동형 단백질(isoform)은 비만 및 2형 당뇨병 환자에서 체중 감소와 혈청 지질 농도를 낮추는 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 또한, FGF21은 심장 근육과 이자에서 항염증 효과가 알려져 있다. 이처럼 다양한 역할을 가진 FGF21은 대사 증후군 치료에 유망한 약물이다. 이에 따라 인간 FGF21(hFGF21)을 생산하기 위한 시도가 있었으나 높은 제조 비용에도 불구하고 생활성 단백질의 수율이 높지 않은 문제가 있었다.
- [0004] 대장균(*Escherichia coli*; *E. coli*)은 성장이 빠르고 저렴한 배지에서 높은 농도로 성장하며, 다양한 환경에서 재조합 단백질의 생산 수율이 높다는 장점 때문에 발현 숙주세포로 널리 이용되고 있다. 그럼에도 불구하고 *E. coli*에서 몇몇 재조합 단백질을 발현시킬 때 단백질 접힘(protein folding)에 문제가 생기거나 봉입체(inclusion bodies)라고 불리는 단백질 응집이 일어나는 문제가 있었다. 단백질의 활성이 없는 봉입체가 생성되고, 단백질의 수용성 발현, 재접힘(refolding) 및 활성 펩타이드의 정제에 시간이 많이 필요하다는 문제 때문에 *E. coli*에서 hFGF21의 생산이 제한되었다.
- [0005] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 hFGF21에 SUMO(small ubiquitin-related modifier)를 융합하여 단백질의 수용성 발현 및 정제 효율을 향상시키려는 노력이 있었고, 또 다른 연구에서는 hFGF21을 최적화된 발효 조건에서 수용성 형태로 발현시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 재조합 단백질을 진핵세포에서 생산하는 플랫폼은 hFGF21의 수용성 발현을 가능하게 하지만, 낮은 생산성, 단백질의 과당화(hyper-glycosylation), 및 펩타이드의 N 말단에서 단백질분해(proteolysis)가 일어나는 문제가 있었다.
- [0006] 이에 본 발명자들은 hFGF21 단백질의 생산 효율성을 최적화하기 위해서 예의 노력한 결과, 재조합 hFGF21의 제조 시 8종류의 서로 다른 펩타이드 태그(peptide tag)를 사용하였고, 그 결과 MBP(maltose-binding protein, 말토스 결합 단백질) 태그가 단백질 발현 효율 및 수용성을 최적으로 향상시키는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장인자 21(human fibroblast growth factor 21; hFGF21) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수용성 향상 태그 및 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자를 포함하는 재조합 발현백터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계, 상기 형질전환체를 배양하여 MBP-hFGF21 재조합 단백질을 발현시키는 단계 및 상기 재조합 단백질로부터 MBP 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 생산된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 단백질을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그 및 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 대장균 세포질에서 수용성 형태로 단백질을 과발현시킬 수 있는 재조합 hFGF21을 다양한 태그-융합 형태(tag-fused form)로 제작하였으며, 이 중에서, 말토스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP) 태그를 사용하였을 때 높은 수율로 생물학적 활성을 가지는 수용성 hFGF21을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 또한, 담배 식각 바이러스(tobacco etch virus, TEV) 단백질 분해효소(protease)를 태그 제거에 사용하였으며, 관심 표적 단백질은 여러 크로마토그래피를 조합하여 분리하

였다.

- [0015] 본 발명은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장인자 21(human fibroblast growth factor 21; hFGF21) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자는 서열번호 1로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 수용성 향상 태그는 hFGF21 재조합 단백질을 수용성 형태로 발현시킬 수 있는 것이면 어느 것이든 제한 없이 이용 가능하다. 예를 들어, 상기 수용성 향상 태그는 헥사히스티딘(hexahistidine; His6, 서열번호 3), 티오레독신(thioredoxin; Trx, 서열번호 4), 수모(small ubiquitin-related modifier; SUMO, 서열번호 5), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST, 서열번호 6), 말토스 결합 단백질(Maltose Binding Protein; MBP, 서열번호 2), N-이용 기질 단백질 A(N-utilization substance Protein A; NusA, 서열번호 7), 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase; PDI, 서열번호 8) 또는 PDI의 b'a' 도메인(b'a' domain of PDI; PDIb'a', 서열번호 9) 중 어느 하나일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 “벡터(vector)”는 클론 유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 용어 “발현 벡터(expression vector)”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커(selectable marker)를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비(非)-형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0020] 본 발명에서 사용한 게이트웨이 벡터 시스템(Gateway Vector system)은 엔트리 벡터(entry vector)와 목적 벡터(destination vector)로 구성되며, 상기 엔트리 벡터는 목적 유전자의 양 말단에 attL1, attL2를 갖는 벡터이며, 목적 벡터는 attR1, attR2를 포함하는 벡터이다. 상기 엔트리 벡터와 상기 목적 벡터는 목적 벡터의 attR1 및 attR2가 엔트리 벡터의 attL1 및 attL2와 재조합 효소에 의해 LR반응을 일으키며, 이 과정에서 엔트리 벡터에 포함되어 있던 목적 유전자가 목적 벡터로 전달되고, attR1과 attR2는 attB1과 attB2 서열로 치환된다.
- [0021] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 상기 수용성 향상 태그를 용이하게 제거하기 위하여, 수용성 향상 태그를 코딩하는 유전자와 인간 섬유아세포 성장인자 21 유전자 사이에 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 TEVrs는 서열번호 10으로 표시되는 핵산서열을 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*)일 수 있으며, 바람직하게 상기 대장균은 BL21(DE3)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 또한, 본 발명은 수용성 향상 태그 및 hFGF21 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 있어 상기 유전자를 숙주세포의 게놈 염색체에 삽입하여서도 상기과 같이 재조합 벡터를 숙주세포에 도입한 경우와 동일한 효과를 가질 것은 자명하다 할 것이다.
- [0025] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자 조작방법을 사용할 수 있으며, 일 예로는 레트로바이러스 벡터(retrovirus vector), 아데노바이러스 벡터(adenovirus vector), 아데노-연관 바이러스 벡터(adeno-associated vector), 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터(herpes simplex virus vector), 포스바이러스 벡터(poxvirus vector), 렌티바이러스 벡터(lentivirus vector) 또는 비(非)-바이러스성 벡터(non-viral vector)를 이용하는 방법을 들 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 상기 형질전환체를 배양하여 수용성 향상 태그- hFGF21 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및 상기 재조합 단백질로부터 수용성 향상 태그를 제거하는 단계를 포함하는 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21)의 생산방법을 제공한다.

- [0027] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 수용성 향상 태그를 제거하는 단계는 재조합 단백질에 담배 식각 바이러스 (TEV) 프로테아제를 처리하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0028] 한편, 본 발명의 실시예에서는 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질 분해효소(protease)를 사용했지만, 상기 단백질 분해효소(protease)는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 인자 Xa(Factor Xa) 단백질 분해효소, 트롬빈(Thrombin), 엔테로키나제(Enterokinase), 유비퀴틴-특이적 단백질 분해효소(Ubiquitin-specific protease), 푸린(Furin), 유전자 분해효소 I(Genease I) 또는 단백질 분해효소 K(Proteinase K) 등을 적용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 양상에 있어서, 상기 생산방법은 수용성 향상 태그가 제거된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21을 회수하고 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 단백질을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 재조합 단백질의 수용성 향상 태그 및 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21) 유전자가 포함된 유전자 구조체(gene construct)가 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 재조합 벡터 또는 생산방법은 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21)의 수용성 발현 효율 및 생산성을 향상시킬 수 있으며, 이렇게 얻어진 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21은 당뇨, 비만을 포함하는 대사 질환 질병에 대한 광범위한 치료제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 hFGF21 발현 벡터의 제작 과정 및 도메인(domain) 구조의 모식도를 나타낸다. 도1a는 pHMGWA-hFGF21의 벡터 지도를 나타낸다. 대장균 내에서 융합 단백질의 발현은 IPTG(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드) 유도 T7 프로모터에 의해 조절되고, 선택 마커는 암피실린(Amp(R))이다. 도 1b는 His6-hFGF21, SUMO-hFGF21, Trx-hFGF21, GST-hFGF21, PDIB'a'-hFGF21, MBP-hFGF21, NusA-hFGF21, 및 PDI-hFGF21(total size) 융합 단백질의 모식도를 나타낸다. 화살표는 TEV 단백질 분해효소(TEV protease)의 절단 위치를 나타낸다.

도 2는 SDS-PAGE를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) 내에서 8개의 태그들로 융합된 hFGF21의 발현을 분석한 결과이다. 단백질 발현은 0.5 mM IPTG 에 의해 37°C(A) 및 18°C(B)에서 유도되었다. M, 분자량 사이즈 마커(molecular-weight size marker); C, 대조군(control)으로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질(total cell protein); I, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; P, 불용성 세포 펠렛(insoluble cell pellet); S, 세포 초음파 처리 후 수용성 상등액(soluble supernatant).

도 3은 대장균에서 발현된 수용성 MBP-hFGF21으로부터 hFGF21의 정제 과정(A) 및 태그 절단 후 IMAC에서 정제한 결과(B)를 나타낸 것이다. M, 분자량 사이즈 마커; lane 1, 음성 대조군으로서 IPTG 유도 전 총 세포 단백질; lane 2, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, IMAC(immobilized metal ion affinity chromatography, 고정화 금속 이온 친화성 크로마토그래피)에 의해 정제된 MBP-hFGF21 융합 단백질(64.4 kDa); lane 5, TEV 단백질 분해효소로 절단된 MBP 태그: MBP 태그(40.3 kDa), hFGF21(19.45 kDa); lane 6, 최종 hFGF21 단백질(19.45 kDa).

도 4는 hFGF21의 SEC-HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다. 정제된 hFGF21은 순도 분석을 위해 protein-pak 300SW SEC 7.5 $\times$ 300 mm 컬럼을 사용하여 HPLC를 수행하였다. X-축은 체류 시간(분)을 나타내고, y-축은 280 nm에서 흡광도[arbitrary units (AU), 임의값 또는 상대적인 값]를 나타낸다. 순수한 hFGF21의 주요 피크는 20.166분에 나타난다.

도 5는 정제된 hFGF21의 NIH-3T3 세포에 대한 효과를 나타낸다. 여러 농도의 정제된 FGF2가 β -klotho와 함께 NIH-3T3 세포에 형질도입되었다.

도 6은 본 발명의 비교예에 따른 HLA 단백질에 MBP 태그 또는 PDIB'a' 태그를 융합하여 발현시켰을 때 발현율 및 수용성을 확인한 결과이다.

도 7 은 본 발명의 비교예에 따른 (scFv)-Trap* 단백질에 MBP 태그 또는 PDIB'a' 태그를 융합하여 발현시켰을

때 발현을 및 수용성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0038] <실험방법>
- [0040] **1. hFGF21 발현 플라스미드 제작**
- [0042] 서로 다른 재조합 인간 섬유아세포 성장인자 21(hFGF21, human fibroblast growth factor 21)-발현 벡터를 제조하기 위하여 BP 및 LR 재조합을 포함하는 게이트웨이 클로닝(Gateway cloning) 방법을 사용하였다(Nguyen, M. T. *et al.*, *PLoS One* 9(3):e89038. doi: 10.1371/journal.pone.0089038; Nguyen, M. T. *et al.* *PLoS One* 12, e0170602, doi:10.1371/journal.pone.0170602).
- [0043] 담배 식각 바이러스 단백질 분해효소 인식 위치(tobacco etch virus protease recognition site, TEVrs)에 상응하는 올리고뉴클레오타이드 서열(ENLYFQ/G) 뒤에 성숙한 FGF21 단백질(GenBank: AAQ89444.1)의 181개 아미노산 잔기가 이어지는 서열을 합성하였고(GenScript, Piscataway, NJ), 코돈(codon)을 최적화하였다. 다음으로 합성된 타겟 유전자를 BP 반응을 통해 플라스미드 pDONR207로 클로닝하여 엔트리 플라스미드(entry plasmid) pENTR-hFGF21을 얻었다. 융합형 발현을 위한 다른 재조합 플라스미드를 만들기 위해, 상기 pENTR-hFGF21을 LR 반응을 사용하여 N-말단 펩타이드 수용성 태그가 포함된 서로 다른 목적 벡터(destination vectors: pDEST-HGWA, pDEST-SUMO, pDEST-HXGWA, pDEST-HGGWA, pDEST-HMGWA, pDEST-HNGWA, pDEST-PDI, 또는 pDEST-PDIb'a')로 서브 클로닝(subcloning)하였다. 구체적으로, hFGF21을 대장균 세포질에서 발현시킬 때 발현 효율 및 수용성을 향상시키기 위해 표적(target) 유전자를 서로 다른 발현 벡터에 N-말단 펩타이드 수용성 태그와 함께 클로닝시켰다. 상기 수용성 태그는 His6(hexahistidine), Trx(thioredoxin), SUMO(small ubiquitin-related modifier), GST(glutathione S-transferase), MBP(maltose-binding protein), NusA(N-utilisation substance protein A), PDI(human protein disulphide isomerase), 및 PDIb'a'(b'a' domain of PDI)이 사용되었다.
- [0044] 다양한 수용성 향상 태그가 융합된 rHSA 유전자를 포함하는 발현 벡터를 서열 분석(Macrogen, Daejeon, Korea)을 통해 확인하였다(도 1).
- [0046] **실시예 2. 융합 단백질 발현 및 수용성 실험**
- [0048] 8개 결합 태그의 발현 수준 및 수용성을 비교하기 위해, 각각의 발현 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 숙주 세포(Novagen, Madison, WI)에 형질전환하였다. 각 클론의 단일 콜로니를 50 µg/mL 암피실린(ampicillin; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)이 포함된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 밤새(overnight) 배양하였다. 밤새 배양한 접종원을 암피실린이 1:100 비율로 포함된 새로운 LB 배지로 옮긴 후 37°C, 200 rpm에서 배양하였다. hFGF21 융합 단백질의 발현을 유도하기 위하여 배양 배지의 OD₆₀₀가 0.6일 때 0.5 mM IPTG를 배양액에 첨가한 후 37°C에서 5시간 또는 18°C에서 18시간 동안 단백질 발현을 유도하였다. 다음으로 세포를 수확하고, 10% 트리신 겔(tricine gel)을 사용한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyamide gel electrophoresis, 소듐 도데실 설페이트-폴리아미드 겔 전기영동)로 발현 농도를 분석하였다(도 2).
- [0049] 또한 융합 단백질의 발현 및 수용성 정도를 비교하기 위해 밀도측정 방법(densitometry)을 사용하여 단백질 밴드를 분석하였다. 융합 단백질의 발현 정도(%)는 전체 *E. coli* 발현 단백질에 대한 표적 융합 단백질의 밀도 비율에 기초하여 계산하였다. 수용성 정도(%)는 발현된 전체 융합 단백질에 대한 수용성 융합 단백질의 밀도 비율을 기초로 계산하였다.
- [0050] 그 결과, 도 2 및 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, hFGF21 단백질의 발현 효율은 온도 조건 및 융합 태그의 종류에 따라 10%에서 40%까지 차이를 나타내었다. 일반적으로 hFGF21 융합 단백질은 37°C보다 18°C에서 더 높게 발현되었다. PDIb'a' 컨스트럭트(construct)는 두 가지 온도 조건에서 동일한 수준으로 발현되었다. GTS가 융합된 hFGF21은 온도가 낮아졌을 때 발현율이 17.8%에서 10.6%로 감소하였다.
- [0051] 단백질의 수용성 발현 정도 역시 온도 및 융합 태그(fusion tag) 조건에 따라 차이를 나타내었다. 특히 PDI-hFGF21과 MBP-hFGF21은 목적 단백질의 수용성 측면에서 다른 융합 태그 컨스트럭트(construct)와 차이를 나타내었다. 37°C에서 대부분의 융합 단백질은 불용체가 형성된 반면, MBP 및 PDI가 융합된 단백질은 60% 이상이 수용

성 형태로 발현되었다. 또한 발현 온도를 18℃로 낮추면 대부분의 목적 단백질의 수용성이 현저히 향상되었으며, 특히 표 1에 나타난 바와 같이 PDIB'a', MBP, PDI, 및 NusA 태그를 사용하였을 때 융합 단백질의 85% 이상까지 수용성 형태로 발현되는 것을 알 수 있었다.

[0052] MBP 태그의 경우 발현 수준 및 수용성 발현율이 높고, 크기가 작기 때문에 정제 과정의 최적화가 용이하다는 장점이 있어서, 이후 활성 실험에서는 MBP 태그를 사용하였다.

표 1

Tag	Tag size (kDa)	Fusion protein size (kDa)	발현율(%)		수용성(%)	
			37℃	18℃	37℃	18℃
His6	0.8	24.1	25.8	29.1	11.5	36.2
SUMO	11.3	35.8	29.4	31.8	48.8	63.5
Trx	11.7	35.9	29.2	36.4	12.4	48.0
GST	25.6	49.8	17.8	10.6	15.6	62.2
PDIB'a'	30.6	55.1	29.7	29.8	23.1	85.1
MBP	40.2	64.4	35.9	40.6	60.5	88.6
NusA	54.7	79.0	37.7	43.5	23.2	89.1
PDI	54.8	79.3	13.6	15.1	82.1	88.3

[0055] 실시예 3. *E. coli*에서 hFGF21 정제 및 태그 제거

[0057] 상기 실시예 2에서 배양된 세포를 수확하고 $3,800 \times g$, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 펠렛을 -80℃에서 보관하였다.

[0058] 상등액 분획을 준비하기 위하여, 상기 냉동 보관한 세포 펠렛을 50 mL 고정화 금속 이온 친화성 크로마토그래피 (immobilised metal ion affinity chromatography, IMAC) 버퍼(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% 글리세롤 (v/v), pH 8.0)에 재부유시킨 후 초음파 세포 분쇄기 JY99-IIDN(Ningbo Scientz Biotechnology, Guangdong, China)에서 세포가 완전히 균질화될 때까지 초음파 분해 하였다. 세포가 완전히 분해되었을 때 세포 용출물을 $23,000 \times g$, 4℃에서 20분간 원심분리한 후, 상등액을 공경의 크기가 약 0.4-μm인 막(membrane)으로 여과하여 불용성 세포 분획을 제거하였다.

[0059] 5 CV(column volumes, 컬럼 부피)의 IMAC 버퍼(buffer)로 평형화한 후, 5-mL HisTrap FF 컬럼(GE ealthcar, Piscataway, NJ)을 사용하여 상등액으로부터 MBP-hFGF21을 정제하였다. 컬럼에 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위해 50 mL 이미다졸을 포함한 5 CV의 IMAC 버퍼로 충분히 세척하였다. 다음으로 컬럼을 1 M의 이미다졸을 포함한 5 CV의 IMAC 버퍼로 세척하여 MBP-hFGF21 융합 단백질을 완전히 용출시켰다.

[0060] TEV 프로테아제 활성을 방해하는 NaCl 및 이미다졸을 제거하기 위하여, 태그 제거 전에 정제된 융합 단백질을 NaCl이 없는 IMAC 버퍼(20 mM Tris-HCl, 5% 글리세롤 [v/v], pH 8.0)로 희석시켰다. 다음으로 상기 융합 단백질에 TEV 단백질 분해효소(protease)를 1:10 (w/w) 비율로 첨가하고, 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 태그 제거 후 단백질 정제를 위해 반응 시료에 NaCl을 첨가하여 500 mM로 농축시키고, IMAC 버퍼 5 CV 로 평형화시킨 5-mL HisTrap FF 컬럼에 로딩하였다. hFGF21 단백질을 용출시키기 위해 상기 컬럼을 50 mM 이미다졸을 포함한 IMAC 버퍼 5 CV 로 세척하였다. 다음으로 1 M 이미다졸을 포함한 IMAC 버퍼 5 CV로 컬럼을 세척하여 MBP 태그와 TEV 단백질 분해효소(protease)를 완전히 제거하였다. 다음으로 엔도톡신(endotoxin)을 제거하고, 순수한 hFGF21 단백질은 4℃에서 PBS에 희석하고 동결건조시킨 후 다음 실험에 사용하였다. 단백질 농도를 측정할 때는 BSA를 표준으로 하는 브래드포드 분석(Bradford assay)을 사용하였다.

[0061] 단백질 분획을 10% 트리신 SDS-PAGE 겔에서 확인하기에 앞서, 시료를 5X 버퍼(312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% 글리세롤, 5% SDS, 0.05% 브로모페놀 블루(bromophenol blue) (100 mM DTT)와 혼합하였다. SDS-PAGE 수행 후, 단백질 밴드를 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue R-250)로 염색하였다. 융합 단백질의 상대적 발현량 및 수용성과 표적 단백질의 순도를 평가하기 위하여 ImageJ 소프트웨어 (<http://imagej.nih.gov/ij>)를 사용하였고, 순도 분석 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0062] 대장균에서 발현된 수용성 MBP-hFGF21으로부터 hFGF21의 정제 과정을 도 3A에 나타내었다. 첫 번째 IMAC은 융합 단백질을 수득하는 데 필요한 과정이고, 두 번째 IMAC은 TEV 단백질 분해효소(protease) 처리를 통한 태그 절단

후 표적 단백질만 분리하는데 필요한 과정이다. MBP-hFGF21 발현 벡터로 형질전환한 BL21(DE3) *E. coli*를 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 18℃에서 18시간 동안 발현을 유도한 후 수확하였다. IPTG 처리하지 않은 세포(도 3B, lane 1)와 비교하여, 발현 유도된 세포 분획에서 MBP-hFGF21 재조합 단백질을 확인할 수 있었다(도 3B, lane 2). 세포를 초음파 분쇄시킨 후 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 초음파 처리 후 대부분의 용합 단백질이 수용성 형태로 남아 있어서 전체 세포와 상등액 분획은 유의미한 차이가 나타나지 않았다(도 3B, lane 3). 상등액을 여과한 후 니켈 크로마토그래피 컬럼에 로딩(loading)하고, MBP-hFGF21을 용출시켰다. SDS-PAGE 결과 용출된 시료는 ~73.1%의 순도로 MBP-hFGF21 단백질을 포함하고 있었다(도 3B, lane 4, 표 2). 상기 정제된 MBP-hFGF21 단백질을 TEV 단백질 분해효소(protease)로 처리한 후, 상온에서 8시간 동안 반응시킨 결과 MBP 태그가 절단된 것을 확인할 수 있었다(도 3B, lane 5). 다음으로, HisTrap FF 컬럼을 사용하여 태그 제거 혼합물로부터 hFGF21을 분리하였다. 태그가 절단된 hFGF21은 95.4%의 순도로 컬럼에서 용출되었고(도 3B, lane 6, 표 2), MBP 태그, 태그가 제거되지 않은 MBP-hFGF21, 및 TEV 단백질 분해효소(protease)는 컬럼에 붙어 있었다.

[0063] 실험 조건에서, 500 mL 세포 배양액으로부터 태그가 절단된 hFGF21 단백질이 총 8.1 mg 수득되었다(표 2).

[0064] 정제된 hFGF21의 순도를 분석하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피와 결합된 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC, size exclusion chromatography with high-performance liquid chromatography))를 실시하였다. protein-pak 300SW SEC 7.5 x 300 mm 컬럼을 pH 7.4에서 10 CV 이상의 PBS(phosphate buffered saline, 인산 완충 식염수)로 세척하여 평형화시킨 후 단백질을 컬럼에 40분간 1 mL/분 속도로 로딩하였다. 용출 피크(elution peak)는 280 nm에서 측정하였고, 실험은 상온에서 진행하였다. 그 결과, hFGF21의 주요 피크는 20.166분에 나타났다(도 4). SEC-HPLC 분석 결과 hFGF21의 순도는 약 96%인 것을 알 수 있었다.

표 2

[0065]

정제 단계	총 단백질(mg)	순도(%)	hFGF21 (mg)	수율(%)
세포 무게	1900 (pellet)	-		-
상등액	252.0	40.6	30.9	100
1차 IMAC	50.0	73.1	11.0	34.0
2차 IMAC	8.5	95.4	8.1	26.2

[0067] **실시예 4. *E. coli*에서 TEV 프로테아제 정제**

[0069] TEV 단백질 분해효소(protease) 절단 위치 서열(서열번호 10)을 포함하는 플라스미드 pRK793를 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환하였다. 상기 세포는 OD₆₀₀가 0.6 ~ 0.8일 때 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 30℃에서 18 시간 동안 발현을 유도시켰다. 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 상등액을 제조하였다. 간단하게, 단백질 배양액을 20-mL HisTrap FF 16/10 컬럼에 로딩한 후, 100 mM의 이미다졸을 포함하는 IMAC 버퍼 5 CV로 세척하여 컬럼에 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하였다. 1 M의 이미다졸을 포함하는 IMAC 버퍼 5 CV로 세척하여 TEV 단백질 분해효소(protease)를 용출시킨 후, 5 mM DTT(dithiothreitol, 디티오프레이톨)를 첨가하여 응집을 막았다. 용출된 시료는 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units를 사용하여 10 ~ 15 mL로 농축하였고, 다음으로 HiPrep 16/10 Desalting 컬럼에 로딩하여 NaCl을 제거하였다. 그리고 버퍼를 스택 버퍼(stock buffer; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100) [v/v], 10% 글리세롤 [v/v])로 교환하였다. 다음으로 시료에 2.5 mM DTT를 첨가하여, TEV 단백질 분해효소(protease)를 -80℃에서 보관하였다. TEV 단백질 분해효소(protease)의 활성은 약 2.0 U/μL이었다(1 U의 TEV 단백질 분해효소(protease)가 25℃에서 용합 단백질 5.5 μg의 ~90%를 절단한다).

[0071] **실시예 5. 내독소 제거(endotoxin removal)**

[0073] 내독소를 제거하기 위하여, 단백질 시료를 1% Triton X-114와 4℃에서 30분 간 반응시키고, 상기 혼합물을 상온에 10분간 두었다. 응집물은 23,000 × g, 상온에서 10분간 원심분리하여 제거하고, Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate test (Lonza, Basel, Switzerland)를 이용하여 내독소 농도를 평가하였다. Triton X-114 처리를 한 hFGF21를 Limulus Amebocyte Lysate(LAL)과 37℃에서 10분간 반응시킨 후 기질을 첨가하였다. 다음으로 정지 시약(25% v/v 빙초산(glacial acetic acid))을 첨가하고 405 ~ 410 nm 파장에서 p-니트로아닐린(p-nitroaniline)을 측정하였다.

[0074] 내독소 분석 결과 Triton X-114 처리된 hFGF21은 0.1 EU/μg 보다 낮은 농도의 내독소를 포함하며, 단백질 의약

품으로서 상업적, 임상적 허용 한계(<1 EU/μg) 이하인 것으로 확인되었다.

[0076] **실시예 6. hFGF21 단백질의 활성 분석**

[0078] 베타-클로토(β-klotho) 유전자를 NIH-3T3 세포로 형질주입한 후, 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂, 포화습도 조건으로 배양하였다. 형질주입 하루 전에 각 웰마다 500 μL의 완전 배지가 포함된 48-웰 플레이트(48-well plate)에 약 2×10^5 세포를 심었다. 다음으로 배지를 페니실린-스트렙토마이신이 없는 400 μL 새로운 배지로 교체하고, 세포를 PEI를 사용하여 베타-클로토 플라스미드에 형질주입하였다. 즉, 0.5 μg의 플라스미드와 1.5 μg의 PEI를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 각각의 웰에 플라스미드-PEI 혼합물을 넣고 최종 부피가 500 μL가 되도록 한 후, 형질전환된 세포가 있는 플레이트를 24시간 배양하였다.

[0079] hFGF21의 활성을 분석하기 위하여 상기 베타-클로토가 형질도입된 NIH-3T3 세포를 사용하였다. 형질도입 24시간 후에 사용한 배지를 제거하고, 형질도입된 세포를 1% FBS가 포함된 배지(starvation medium)에서 배양하였다. 단백질의 활성을 측정하기 위하여, 48-웰 플레이트에 있는 형질도입된 NIH-3T3 세포를 서로 다른 농도(0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50, 100, 250, or 500 ng/mL)의 정제된 재조합 hFGF21 또는 상업적으로 판매되는 hFGF21(Prospect, East Brunswick, NJ)과 함께 반응시켰다. 24시간 후에 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존능을 계산하였고, 모든 단백질 농도에서 3회씩 실험하였다.

[0080] 먼저, 베타-클로토는 hFGF21이 FGF 수용체에 결합으로 활성화되며, NIH-3T3 세포주에 형질도입되어 발현된다. NIH-3T3 세포에 일시적으로 형질전환된 재조합 hFGF21의 효율을 세포 증식 분석(cell proliferation assay)으로 측정하였다. 다양한 농도의 정제된 hFGF21 및 판매되는 hFGF21에 대해 실험한 결과를 도 5에 나타내었다.

[0081] 24시간 동안 배양한 후 세포 증식을 MTT 분석법으로 측정한 결과, 베타-클로토가 형질도입된 NIH-3T3 세포는 hFGF21의 농도 의존적으로 활성이 증가한 것을 알 수 있었다. 5 nM 이하의 농도에서 농도 반응곡선은 S자형을 나타낸 반면, 5 nM 이상에서는 세포 증식 반응이 감소하여 종 모양 곡선을 나타내었다(도 6).

[0082] 최대 유효농도의 절반 값(half maximal effective concentrations, EC₅₀s)은 상업적으로 판매되는 hFGF21에서 300.01 ± 0.00 pM(Hill coefficient = 0.48 ± 0.01)이고, 정제된 재조합 hFGF21에서 300.03 ± 0.01 pM(Hill coefficient = 0.50 ± 0.02)로, EC₅₀s와 힐 상수의 차이는 통계적으로 유의미한 차이가 없었다. 형질도입되지 않은 세포는 세포 증식 효과가 나타나지 않았다(데이터 없음).

[0083] 이로부터 본 발명의 실시예에 따라 재조합 단백질을 생산하고 정제하는 방법으로 상업적으로 판매되는 재조합 단백질과 거의 동일한 hFGF21을 생산하고 분리할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0085] **데이터 분석**

[0086] 모든 데이터는 GraphpadPrism 5 software(GraphPad, San Diego, CA)를 이용하여 분석하였고, $P \leq 0.05$ 일 때 유의미한 것으로 보았다. 데이터는 하기 식으로 Microsoft Excel software에서 계산하였다:

$$[0087] Re = BI + (Max - BI)/(1 + (EC_{50}/conc)^{Hs}) - (Max - Bh)/(1 + (IC_{50}/conc)^{Hi}) \quad (1)$$

[0088] 상기 Re는 세포의 반응(response of cells)이고, Max는 최대 반응(maximum response)이고, conc는 단백질의 농도(concentration of the protein)이고, Bh는 고농도일 때 기준값(baseline at high concentration)이고, Hs는 자극의 힐 상수(Hill coefficient of stimulation)이고, Hi는 억제의 힐 상수(Hill coefficient of inhibition)이다.

[0089] 모든 데이터 값은 $n \geq 3$ 인 개별 실험의 평균±표준편차로 나타내었다. 반응의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test using Graphpad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, CA)로 계산하였고, $p < 0.05$ 일 때 유의미한 것으로 보았다.

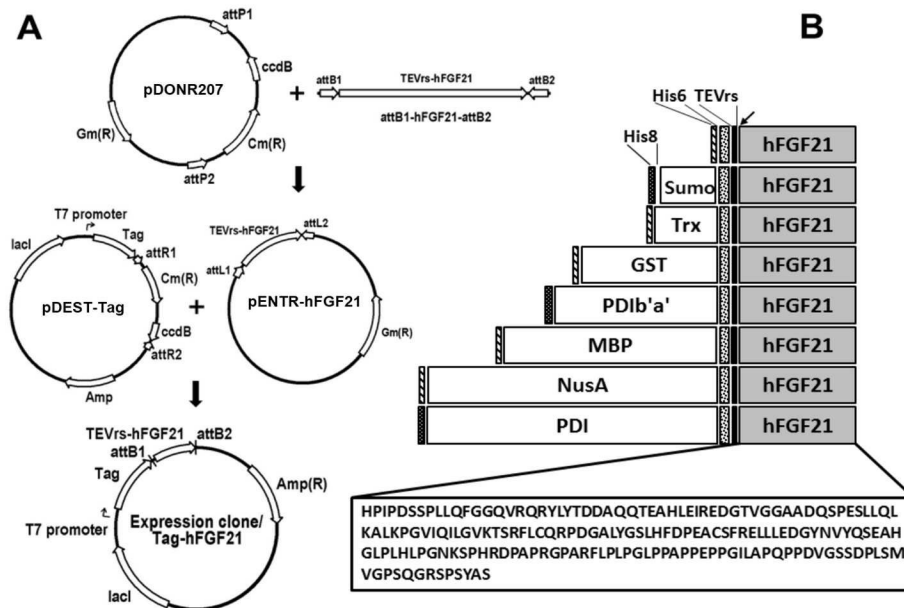
[0091] **비교예 1. HLA(Human Leukocyte Antigen) 단백질의 수용성 발현 여부 확인**

[0093] 본 발명의 수용성 태그로 사용된 MBP 및 PDIB' a' 태그를 융합하여 재조합 단백질을 발현시켰을 때, 다른 목적 단백질에서도 수용성 발현을 하는지를 확인하기 위하여, 서로 다른 목적 단백질에 각각의 태그를 융합하여 상기 실시예와 동일한 방법으로 발현시켰다.

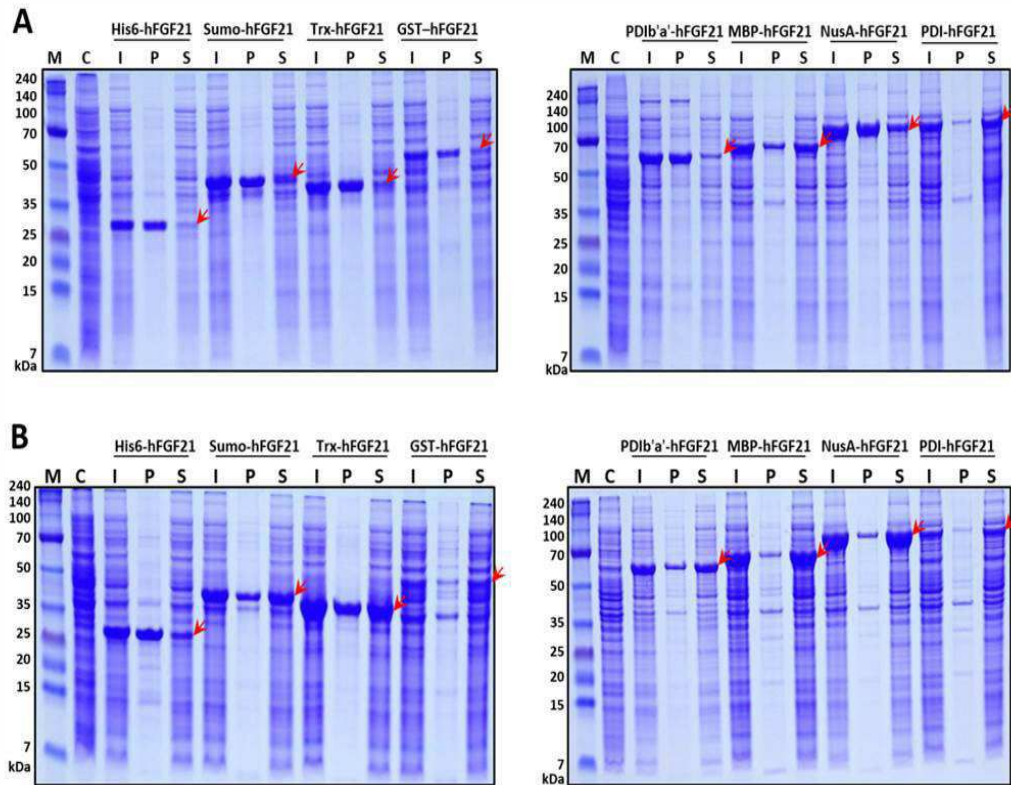
- [0094] 먼저, 4가지 목적 단백질 HLA_A, HLA_B, HLA_C, HLA_{DQ}에 MBP 태그를 융합하여 재조합 단백질을 발현한 결과, 대조군에 비하여 모두 높은 과발현율을 나타내었으나 수용도(solubility)는 서로 다르게 나타났으며, 대부분 수용성이 절반 이하로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다(도 6A).
- [0095] 또한, PDIB' a' 태그 단백질을 융합한 5가지 서로 다른 단백질(HLA_A, HLA_B, HLA_C, HLA_{DR}, HLA_{DQ})을 발현시킨 결과, 역시 대조군에 비하여 모두 높은 과발현율을 보였으나, 낮은 온도(18)에서 발현시켰음에도 불구하고 모두 불용성으로 발현되었다(도 6B).
- [0096] 또한, 서로 다른 두 가지의 단백질(BIi, BIi-Fc)에 MBP, PDIB' a' 태그 단백질을 융합하여 발현시킨 결과, 대조군에 비하여 과발현율이 매우 낮았고, 낮은 비율로 과발현된 단백질은 거의 대부분 펠렛(pellet)에 존재하였다. 이는 발현된 단백질이 대부분 불용성이라는 것을 나타낸다(도 6C).
- [0098] **비교예 2. 다른 목적 단백질의 수용성 발현 여부 확인**
- [0100] PSMA(scFv)-Trap* 단백질을 대장균에서 수용성 과발현하기 위하여 MBP 태그를 융합하여 발현시킨 결과, 높은 과발현율을 보였으나 37℃에서는 모두 불용성이었고, 18에서는 약간 수용도가 증가하였으나 대부분의 과발현 단백질이 여전히 불용성이었다. 또한 Hercept(scFv)-Trap*, CEA(scFv)-Trap* 및 CD22(scFv)-Trap* 단백질의 경우, MBP 태그를 융합하였음에도 불구하고 발현율이 매우 낮았으며, 대부분 불용성 형태로 발현되었다(도 7).

도면

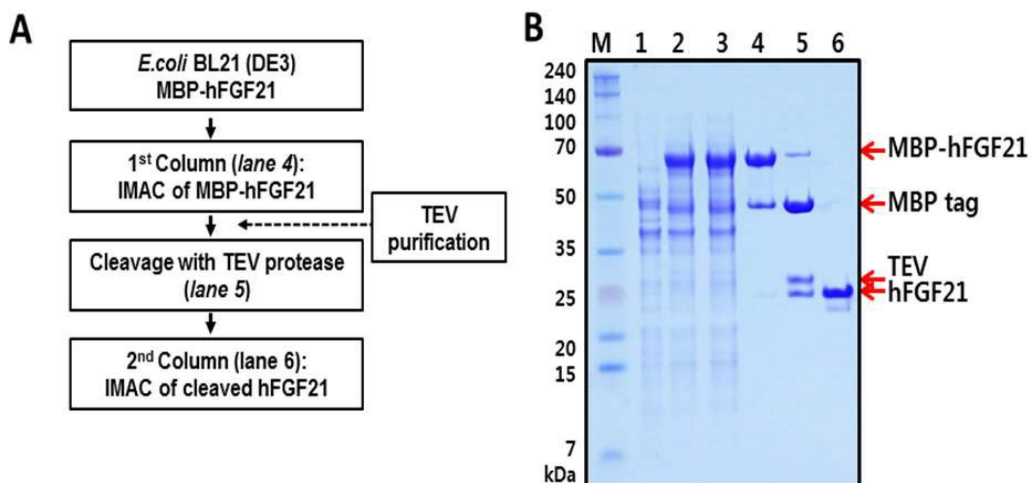
도면1



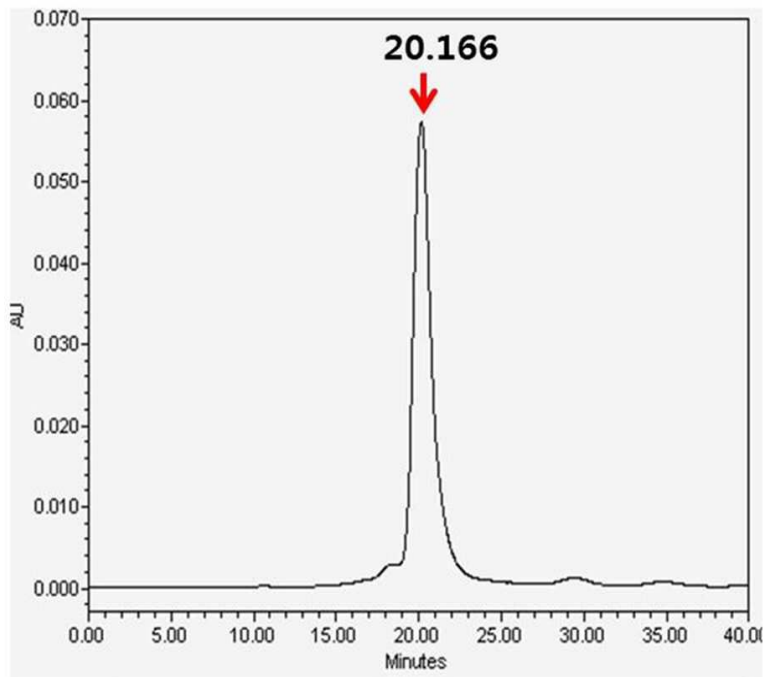
도면2



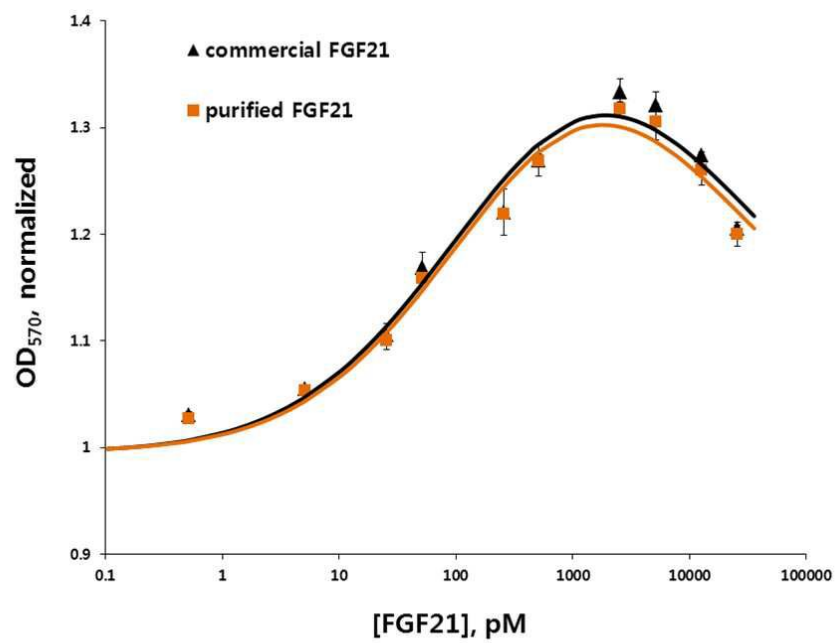
도면3



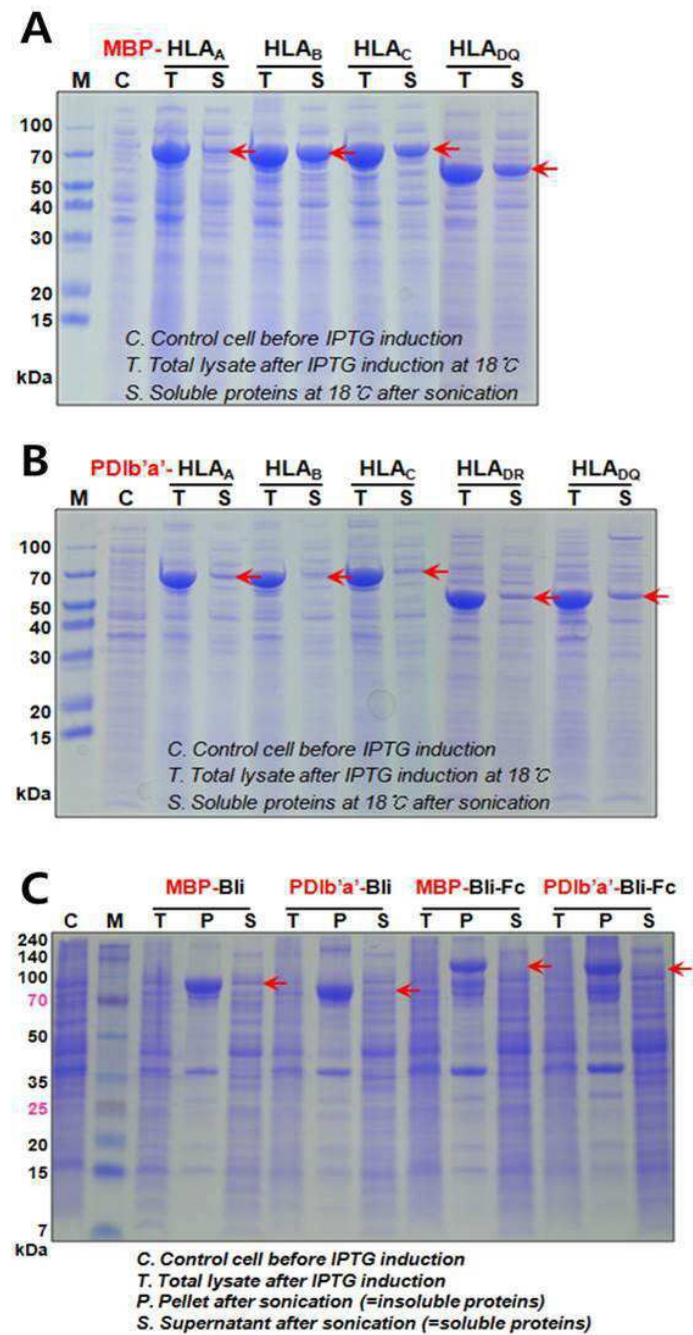
도면4



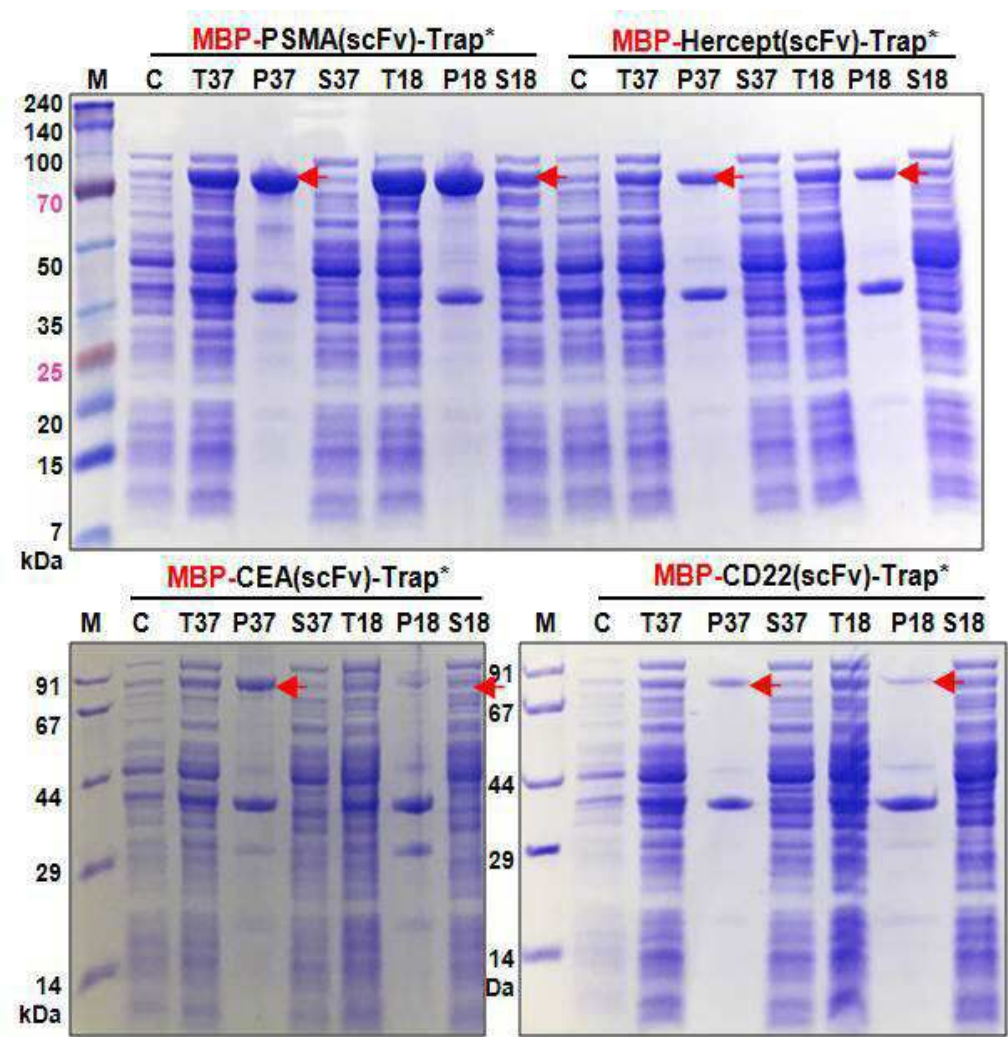
도면5



도면6



도면7



C. Control cell before IPTG induction
T37. Total lysate after IPTG induction at 37 ℃
P37. Insoluble proteins at 37 ℃ after sonication
S37. Soluble proteins at 37 ℃ after sonication
T18. Total lysate after IPTG induction at 18 ℃
P18. Insoluble proteins at 18 ℃ after sonication
S18. Soluble proteins at 18 ℃ after sonication

서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION
- <120> Method for soluble overexpression of active recombinant human
fibroblast growth factor 21
- <130> 1063475
- <160> 10
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 546
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hFGF21
 <400> 1

cacccgatcc cggactcctc accgctgctg caatttggcg gccaggtccg tcaacgtat 60
 ctgtacaccg atgacgcaca gcaaaccggaa gctcatctgg aaattcgtga agatggtagc 120

gtgggcggtg cagcagacca gagccccgaa tctctgctgc aactgaaagc actgaaaccg 180
 ggcgtgattc agatcctggg tggttaaacg tctcgtttcc tgtgccaacg cccggatggc 240
 gcgctgtatg gtagtctgca ttttgaccgg gaagcctgtt ccttcctga actgctgctg 300
 gaagatggtt ataacgttta ccagtcagaa gcacatggtc tgccgctgca cctgccgggt 360
 aataaatcgc cgcaccgtga cccggcaccg cgtgggtccg cacgcttcct gccgctgccg 420
 ggtctgccgc cggcaccgcc ggaaccgccg ggcatcctgg ctccgcagcc gccggatgtc 480
 ggttcatctg atccgctgtc aatggtcggc ccgtccaag gtcgttcacc gtcatacgt 540

tcataa 546

<210> 2
 <211> 1116
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MBP tag
 <400> 2

aaaactgaag aaggtaaaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggtctc 60
 gctgaagtgc gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg 120
 gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt gcggcaactg gcgatggccc tgacattatc 180
 ttctggggcac acgaccgctt tgggtggctac gctcaatctg gcctgttggc tgaaatcacc 240
 ccggacaaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac 300

ggcaagctga ttgcttaccg gatcgtgtt gaagcgttat cgctgattta taacaaagat 360
 ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa gagatcccgg cgctggataa agaactgaaa 420
 gcgaaaggta agagcgcgt gatgttcaac ctgcaagaac cgtacttcac ctggccgctg 480
 attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaaagac 540
 gtgggcgtgg ataacgtgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcctgggtga cctgattaaa 600
 aacaaacaca tgaatgcaga caccgattac tccatgcag aagctgcctt taataaaggc 660

gaaacagcga tgaccatcaa cggcccggtg gcatggtcca acatcgacac cagcaaagtg 720

aattatggtg taacggtact gccgaccttc aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc 780

gtgctgagcg caggtattaa cgccgccagt ccgaacaaag agctggcaaa agagttcctc 840

gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg gaagcggtta ataaagacaa accgctgggt 900

gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggcgaaag atccacgtat tgccgccacc 960

atggaaaacg ccagaaagg tgaaatcatg ccgaacatcc cgcagatgtc cgctttctgg 1020

tatgccgtgc gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc 1080

ctgaaagacg cgcagactgg taccggatct tacatc 1116

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> His6 tag

<400> 3

catcatcatc atcatcac 18

<210> 4

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trx tag

<400> 4

agcgataaaa ttattcacct gactgacgac agttttgaca cggatgtact caaagcggac 60

ggggcgatcc tcgtcgattt ctgggcagag tgggtcggtc cgtgcaaaat gatcgccccg 120

attctggatg aaatcgctga cgaatcatg ggcaaaactga ccgttgcaaa actgaacatc 180

gatcaaaacc ctggcactgc gccgaatat ggcatccgtg gtatcccgac tetgctgctg 240

ttcaaaaacg gtgaagtggc ggcaacaaaa gtgggtgcac tgtctaaagg tcagttgaaa 300

gagttcctcg acgctaacct ggcc 324

<210> 5

<211> 294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SUMO tag

<400>	5	
atgtcggact cagaagtcaa tcaagaagct aagccagagg tcaagccaga agtcaagcct	60	
gagactcaca tcaatttaaa ggtgtccgat ggatcttcag agatcttctt caagatcaaa	120	
aagaccactc cttaagaag gctgatggaa gcgttcgcta aaagacaggg taaggaaatg	180	
gactccttaa gattcttgta cgacgttatt agaattcaag ctgatcagac ccctgaagat	240	
ttggacatgg aggataacga tattattgag gctcacagag aacagattgg tggg	294	
<210>	6	
<211>	675	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GST tag	
<400>	6	
tcccctatac taggttattg gaaaattaag ggctttgtgc aaccactcg acttcttttg	60	
gaatatcttg aagaaaaata tgaagagcat ttgtatgagc gcgatgaagg tgataaatgg	120	
cgaacaaaa agtttgaatt gggtttggag tttcccaatc ttccttatta tattgatggt	180	
gatgttaaat taacacagtc tatggccatc atacgttata tagctgacaa gcacaacatg	240	
ttgggtgggt gtccaaaaga gcgtgcagag atttcaatgc ttgaaggagc ggttttggat	300	
attagatacg gtgtttcgag aattgcataat agtaaagact ttgaaactct caaagttgat	360	
tttcttagca agctacctga aatgctgaaa atgttcgaag atcgtttatg tcataaaaca	420	
tatttaaatg gtgatcatgt aaccatcct gacttcatgt tgtatgacgc tcttgatgtt	480	
gttttataca tggaccaat gtgcctggat gcgttccaa aattagtttg ttttaaaaa	540	
cgtattgaag ctatccaca aattgataag tacttgaaat ccagcaagta tatagcatgg	600	
cctttgcagg gctggcaagc cacgtttggt ggtggcgacc atccccaaa atcggatggt	660	
accggatctt acatc	675	
<210>	7	
<211>	1482	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NusA tag	
<400>	7	
aacaaagaaa ttttggctgt agttgaagcc gtatccaatg aaaaggcgct acctcgcgag	60	
aagattttcg aagcattgga aagcgcgctg gcgacagcaa caaagaaaa atatgaacaa	120	

gagatcgacg tccgcgtaca gatcgatcgc aaaagcgggtg attttgacac tttccgtcgc 180
 tggttagttg ttgatgaagt caccagccg accaaggaaa tcacccttga agccgcacgt 240
 tatgaagatg aaagcctgaa cctgggcgat tacgttgaag atcagattga gtctgttacc 300

tttgaccgta tctactacca gacggcaaaa caggttatcg tgcagaaagt gcgtgaagcc 360
 gaacgtgcga tgggtggttga tcagttccgt gaacacgaag gtgaaatcat caccggcgtg 420
 gtgaaaaaag taaaccgcga caacatctct ctggatctgg gcaacaacgc tgaagccgtg 480
 atcctgcgcg aagatatgct gccgcgtgaa aacttccgcc ctggcgaccg cgttcgtggc 540
 gtgctctatt ccgttcgcc ggaagcgcgt ggcgcgcaac tgttcgtcac tcgttccaag 600
 ccggaatgc tgatcgaact gttccgtatt gaagtgccag aaatcggcga agaagtgatt 660
 gaaattaaag cagcggctcg cgatccgggt tctcgtgcga aaatcgcgtg gaaaaccaac 720

gataaacgta tcgatccggt aggtgcttgc gtaggtatgc gtggcgcgcg tgttcaggcg 780
 gtgtctactg aactgggtgg cgagcgtatc gatatcgtcc tgtgggatga taaccggcg 840
 cagttcgtga ttaacgcaat ggcaccggca gacgttgctt ctatcgtggt ggatgaagat 900
 aaacacacca tggacatcgc cgttgaagcc ggtaatctgg cgcaggcgat tggccgtaac 960
 ggtcagaacg tgcgtctggc ttcgcaactg agcggttggg aactcaacgt gatgaccgtt 1020
 gacgacctgc aagctaagca tcaggcggaa gcgcacgcag cgatcgacac cttcaccaaa 1080
 tatctcgaca tcgacgaaga cttcgcgact gttctggtag aagaaggctt ctcgacgctg 1140

gaagaattgg cctatgtgcc gatgaaagag ctgttggaat tcgaaggcct tgatgagccg 1200
 accgttgaag cactgcgcga gcgtgctaaa aatgcactgg ccaccattgc acaggcccag 1260
 gaagaaagcc tcggtgataa caaacggct gacgatctgc tgaaccttga aggggtagat 1320
 cgtgatttgg cattcaaaact ggccgcccggt ggcggttggta cgctggaaga tctcgccgaa 1380
 cagggcattg atgatctggc tgatatcgaa gggttgaccg acgaaaaagc cggagcactg 1440
 attatggctg cccgtaatat ttgctggttc ggtgacgaag cg 1482

<210> 8
 <211> 1461
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDI tag

<400> 8

gacgcaccgg aagaagagga tcatgtcctg gttctgcgca aaagcaactt cgcggaagca 60
 ctggccgcac ataaatatct gctggtggaa ttttatgctc cttggtgcgg tcattgcaaa 120

gccctggccc cggagtacgc caaagccgca ggtaactga aagctgaagg tagcgaaatc 180
 cgcctggcaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc 240
 ggctatccta caattaaatt cttccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatc 300
 gctgggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg cctgcccga 360

accacctgc ctgatggcgc tgcgtccgaa agcctggtcg aaagtagcga agttgccgtc 420
 attggtttct ttaaggatgt agaactcgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag 480
 gctatcgatg acatcccggt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaatacaca 540
 ctggataaag acggcggtgt gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgcaa caactttgag 600
 ggtgagggtga ccaaggagaa cctgctggat tttattaagc acaaccaact gccgctggtt 660
 attgaattta cagaacaaac ggccgccgaa attttcggcg gtgagattaa aacacatc 720
 ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc 780

gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 840
 aatcagcgtg tcctggagtt ctttgggtctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 900
 attacgtcgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 960
 cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 1020
 caggaaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg gaagaatttt 1080
 gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 1140
 gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 1200

gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 1260
 cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgcgg atcgtactgt cattgattat 1320
 aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 1380
 gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 1440
 gatgacgacc agaaagcgt c 1461

<210> 9
 <211> 801
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PDIB'a' tag
 <400> 9

attgaattta cagaacaaac ggccgccgaa attttcggcg gtgagattaa aacacatc 60

ctgctgtttc tgccgaagag cgtttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc 120

gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac 180
aatcagcgta tcctggagtt ctttggctctg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg 240
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa 300
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcctg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc 360
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctggtggg gaagaat ttt 420
gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt 480

gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac 540
gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta 600
cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgagg atcgtactgt cattgattat 660
aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 720
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 780
gatgacgacc agaaagcggg c 801

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEVrs

<400> 10

gaaaatctgt acttccaagg t 21